

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2002-139418

(P2002-139418A)

(43) 公開日 平成14年5月17日 (2002.5.17)

(51) Int.Cl.

識別記号

F I

テームト* (参考)

G 0 1 N 21/03

G 0 1 N 21/03

Z 2 G 0 4 3

21/64

21/64

G 2 G 0 5 7

F 4 B 0 6 3

// C 1 2 Q 1/06

C 1 2 Q 1/06

審査請求 未請求 請求項の数4 O L (全 7 頁)

(21) 出願番号

特願2000-334221(P2000-334221)

(22) 出願日

平成12年11月1日(2000.11.1)

(71) 出願人 000004112

株式会社ニコン

東京都千代田区丸の内3丁目2番3号

(72) 発明者 菅 隆之

東京都千代田区丸の内3丁目2番3号 株

式会社ニコン内

(74) 代理人 100091557

弁理士 木内 修

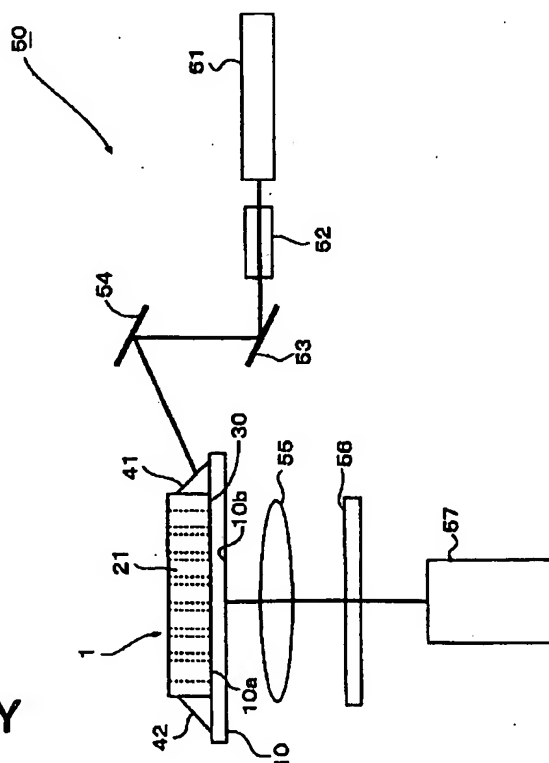
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 マイクロウェルプレート及びマイクロウェルプレートを備える蛍光検出装置

(57) 【要約】

【課題】 試料以外に対する励起光の照射を低減して高いS/N比で試料から発生する蛍光を検出できるマイクロウェルプレート及びマイクロウェルプレートを備える蛍光検出装置を提供する。

【解決手段】 透明基板10の上面にウェル21が所定ピッチで形成されたウェル形成部材20を配置する。ウェル形成部材20と透明基板10との間に反射膜30を設けている。透明基板10の上面10aにはプリズム41、42が密着する。プリズム41から透明基板10に臨界角以上の入射角で励起光Lを入射させると、励起光Lは透明基板10の上面10a及び下面10bで全反射を繰り返しながら伝搬し、透明基板10の上面10a及び下面10bの近傍外側にエバネセント波が発生する。このエバネセント波によってウェル21中の試料中の蛍光色素を励起して、透明基板10の上面10aと試料との境界面近傍の蛍光色素だけを励起させる。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 互いに平行な上面及び下面で励起光を全反射可能な透明基板と、
この透明基板の上面に配置され、少なくとも1つのウエルを有するウエル形成部材とを備え、
前記透明基板の上面と前記ウエル形成部材の下面との間に反射膜を設けたことを特徴とするマイクロウエルプレート。

【請求項2】 前記励起光を所定の入射角度で前記透明基板内へ入射させる励起光入射用光学部材を備えていることを特徴とする請求項1記載のマイクロウエルプレート。

【請求項3】 前記透明基板の上面及び下面で全反射した励起光を外部へ出射させる励起光出射用光学部材を備えていることを特徴とする請求項1又は2記載のマイクロウエルプレート。

【請求項4】 請求項1～3のいずれか1項記載のマイクロウエルプレートを備えることを特徴とする蛍光検出装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 この発明は試薬のスクリーニングを行なうとき等に使用されるマイクロウエルプレート及びマイクロウエルプレートを備える蛍光検出装置に関する。

【0002】

【従来の技術】 薬の研究においてスクリーニングは薬効を解くキーとなる重要な技術である。

【0003】 スクリーニングを行なうときには複数のウエルを備えるマイクロウエルプレートが使用されることが多い。このマイクロウエルプレートは通常透明又は黒色のプラスチックで形成されている。

【0004】 細胞を使用したスクリーニングでは予め各ウエルに細胞を導入し、この細胞に試薬を投与したときの細胞の変化を検出して試薬の効果を評価する。

【0005】 古くは放射線標識したプローブを使用して放射性物質の有無から細胞中の変化を検出していたが、近年は蛍光性のプローブを使用して蛍光強度の変化等から細胞中の変化を検出している。

【0006】 この蛍光性のプローブを使用した検出方法は例えば下記の蛍光検出装置を用いて行なわれる。

【0007】 図5は従来のマイクロウエルプレートを備える蛍光検出装置の概略構成図である。

【0008】 この蛍光検出装置は、水銀灯の光源151と、励起波長を選択する励起フィルタ158と、励起光を反射し蛍光を透過させるダイクロイックミラー159と、レンズ155と、マイクロウエルプレート101と、蛍光だけを透過させる吸収フィルタ156と、2次元に配置されたCCDを備えるCCDカメラ157とから構成される。

【0009】 なお、マイクロウエルプレート101は、透明基板110と、少なくとも1つのウエル121を有するウエル形成部材120とを備えている。ウエル形成部材120は透明基板110の上面に設けられている。

【0010】 光源151から出射された光（励起光）は励起フィルタ158を透過した後、ダイクロイックミラー159で反射し、レンズ155によって透明基板110の下面全体に照射される。

【0011】 透明基板10を透過した励起光の照射によって各ウエル121中の細胞から発生した蛍光は、透明基板110、レンズ155へと光路を逆行し、ダイクロイックミラー159及び吸収フィルタ156を透過してカメラ157へ入射し、CCDで検出される。

【0012】 この蛍光検出装置によれば一度の光の照射によって総てのウエル121内の細胞からの蛍光をCCDで検出することができる。

【0013】 なお、別の検出方法として次の方法がある。レンズ155の代わりに図示しないレンズによって励起光を複数のウエル121のいずれか1つに集光させ、そのウエル121内の細胞からの蛍光を光電子倍增管で検出し、その後マイクロウエルプレート101を2次元方向へ動かして光路上の別のウエルを位置させ、同様の検出を繰り返す。このようにして総てのウエル121内の細胞からの蛍光を検出する。

【0014】 上記装置を用いて各ウエル121での試薬を投与する前後の細胞の蛍光強度等の変化を検出し、投与した試薬の効果を評価する。

【0015】

【発明が解決しようとする課題】 しかし、励起光は細胞だけでなくウエル形成部材120やウエル121内の溶液にも照射され、ウエル形成部材120や溶液で蛍光が発生する。

【0016】 このウエル形成部材120や溶液で発生する蛍光は細胞で発生する蛍光に対してノイズとなり、蛍光検出のS/N比を低下させるという問題がある。

【0017】 この発明はこのような事情に鑑みてなされたもので、その課題は試料以外に対する励起光の照射を低減して高いS/N比で試料から発生する蛍光を検出できるマイクロウエルプレート及びマイクロウエルプレートを備える蛍光検出装置を提供することである。

【0018】

【課題を解決するための手段】 上記課題を解決するために請求項1に記載の発明は、互いに平行な上面及び下面で励起光を全反射可能な透明基板と、この透明基板の上面に配置され、少なくとも1つのウエルを有するウエル形成部材とを備え、前記透明基板の上面と前記ウエル形成部材の下面との間に反射膜を設けたことを特徴とする。

【0019】 励起光を透明基板中で全反射させたとき、透明基板近傍にエバネセント波が生じる。このエバネセ

ント波で試料中の蛍光色素を励起すれば、透明基板の上面と試料との境界面近傍の蛍光色素だけが励起され、この境界面近傍以外にある物質は励起されない。

【0020】また、透明基板とウエル形成部材とが接合している境界面には反射膜が設けられているので、ウエル形成部材への励起光の侵入が防止される。

【0021】請求項2に記載の発明は、請求項1記載のマイクロウエルプレートにおいて、前記励起光を所定の入射角度で前記透明基板内へ入射させる励起光入射用光学部材を備えていることを特徴とする。

【0022】励起光を透明基板へ入射させるとき、励起光入射用光学部材を用いることによって透明基板の上方から励起光を所定の入射角度で透明基板内へ入射させることができる。

【0023】請求項3に記載の発明は、請求項1又は2記載のマイクロウエルプレートにおいて、前記透明基板の上面及び下面で全反射した励起光を外部へ出射させる励起光出射用光学部材を備えていることを特徴とする。

【0024】透明基板の上面及び下面との間で全反射しながら伝搬した励起光を、透明基板内で散乱させることなく励起光出射用光学部材を介して外部へ出射させることができる。

【0025】請求項4に記載の発明は、請求項1～3のいずれか1項記載のマイクロウエルプレートを備えることを特徴とする蛍光検出装置。

【0026】高いS/N比で試料中の蛍光色素から発生する蛍光を検出してスクリーニングを行うことができる。

【0027】

【発明の実施の形態】以下、この発明の実施の形態を図面に基いて説明する。

【0028】図1はこの発明に係るマイクロウエルプレートの側面図、図2はその平面図である。なお、図2中の黒色部分は透明基板10とウエル形成部材20との接合面である。

【0029】このマイクロウエルプレート1は、透明基板10と、ウエル形成部材20と、反射膜30と、プリズム41（励起光入射用光学部材）とプリズム42（励起光出射用光学部材）とを備える。

【0030】透明基板10の上面10a及び下面10bは互いに平行であり、その上面10a及び下面10bで励起光を全反射可能である。

【0031】透明基板10は石英ガラス、BK7（硼珪クラウンガラス）、プラスチック等で製造される。

【0032】ウエル形成部材20は透明基板10の上面10aに配置されている。このウエル形成部材20には複数（例えば96）のウエル21が所定ピッチでマトリックス状に形成されている。

【0033】ウエル21はウエル形成部材20を厚さ方向へ貫通する孔である。各ウエル21には図示しない試

料が導入されている。

【0034】ウエル形成部材20はプラスチック、石英ガラス、BK7等の部材で製造される。

【0035】ウエル形成部材20と透明基板10とは接着剤によって固着されている。

【0036】反射膜30はウエル形成部材20と透明基板10との間に設けられている。反射膜30はアルミニウム、金等の金属膜や誘電体膜等で形成される。

【0037】なお、反射膜30を透明基板10の上面10aに一体に形成しても、ウエル形成部材20の下面20aに一体に形成してもよい。また、ウエル形成部材20及び透明基板10と別体のシート状の反射膜30としてもよい。

【0038】プリズム41、42は三角プリズムであり、それぞれ透明基板10の上面10aにグリセロール等を介して密着されている。このプリズム41、42は透明基板10と同じ材質が好ましく、例えば石英ガラスで製造される。

【0039】プリズム41は、励起光Lが透明基板10の上面10a及び下面10bとの間で全反射するように、励起光Lを透明基板10の上方から入射させる励起光入射用光学部材として機能する。

【0040】また、プリズム42は励起光Lを透明基板10の上方へ出射させる励起光出射用光学部材として機能する。

【0041】なお、プリズム41、42は透明基板10の上面10a及び下面10bで全反射させることができるものであれば三角プリズムに限られるものではない。

【0042】プリズム41を介して透明基板10に臨界角以上の入射角で励起光Lが入射すると、励起光Lは透明基板10の上面10a及び下面10bで全反射を繰り返しながら伝搬し、透明基板10の上面10a及び下面10bの近傍外側にエバネセント波が発生する。

【0043】このとき、透明基板10の上面10a（ウエル形成部材20と透明基板10との境界面）近傍に発生するエバネセント波によってウエル21中の試料の境界面近傍に存在する蛍光色素が励起される。

【0044】この実施形態によれば、試料の境界面近傍に存在する物質だけが励起され、この境界面近傍以外では溶液中に存在する物質は励起されないため、S/N比を向上させることができる。

【0045】また、透明基板10とウエル形成部材20とが接合している境界面には反射膜30が設けられているので、励起光Lは反射膜30で反射され、ウエル形成部材20への励起光Lの侵入が防止される。

【0046】そのため、境界面で全反射条件が維持され、ウエル形成部材20から発生する蛍光を低減してS/N比を向上させることができる。

【0047】更に、プリズム41を介して上方から透明基板10へ励起光Lを入射させることができるので、薄

い透明基板10の側面から励起光Lを入射させる場合より容易に透明基板10に励起光Lを入射させることができる。

【0048】また、励起光Lを透明基板10内で散乱させることなくプリズム42を介して外部へ出射させることができるので、励起光Lが試料中に侵入して蛍光を発生させることがなく、S/N比をより向上させることができる。

【0049】図3はマイクロウェルプレート1を備える蛍光検出装置の概略構成図であり、マイクロウェルプレートには図1と同一符号を付してその説明を省略する。

【0050】この蛍光検出装置50は、励起光源51と、ビーム整形光学系52と、ミラー53、54と、マイクロウェルプレート1と、レンズ55と、蛍光フィルタ56と、冷却CCDを備えるカメラ57とから構成される。

【0051】励起光源51はアルゴンレーザであり、波長488nmのレーザ光を出射する。

【0052】ビーム整形光学系52はレーザ光のビーム径を調節するとともに、光線群を平行にする。また、必要によってシリンドリカルレンズを挿入して励起光をシート状にすることもできる。

【0053】ミラー53、54は、レーザ光が透明基板10内で全反射するように、レーザ光のプリズム41への入射角を調節する。

【0054】蛍光フィルタ56は蛍光のみを透過させる。

【0055】カメラ57には冷却CCDが2次元に配置されている。なお、冷却CCDは例えば-20℃に冷却されている。

【0056】この蛍光検出装置50を用いたスクリーニングを説明する。

【0057】図4はスクリーニングを説明するフローチャートであり、S1～S10はスクリーニングの各ステップを示す。

【0058】各ウェル21に試料となる細胞を培養する(S1)。

【0059】なお、ウェル21内には細胞を生存させておくための塩溶液が満たしてある。

【0060】培養液をウェル21内から除去する(S2)。

【0061】蛍光色素溶液(カルシウム観察用の蛍光色素fluor 3及びAM体)をウェル21に導入する(S3)。

【0062】マイクロウェルプレート1を図示しない培養器(インキュベータ)内に30分間収容し、細胞を染色する(AM体を用いて蛍光色素fluor 3を細胞内に導入する)(S4)。

【0063】なお、培養器内は37℃程度の温度に保たれている。

【0064】ウェル21から蛍光色素溶液を除去し、塩溶液で数回洗浄後、ウェル21中に塩溶液を導入する(S5)。

【0065】その後、マイクロウェルプレート1を蛍光検出装置50の所定位置に載置する。

【0066】透明基板10内に導入された励起光は透明基板10内で全反射を繰り返しながら伝搬し、透明基板10の上面10a及び下面10bの近傍にエバネセント波が発生する。

【0067】このとき、励起光は反射膜30によって反射されるので、エバネセント波はウェル21と対向する透明基板10の上面10a近傍に発生する。また、反射膜30によってウェル形成部材には励起光は照射されないで、蛍光は発生せず、S/Nが向上する。このエバネセント波の到達距離は200nm程度であるので、エバネセント波は透明基板10の上面10aに密着している細胞だけに照射される。

【0068】エバネセント波によって上面10aに密着している細胞に存在する蛍光色素fluor 3が励起され、蛍光が発生する。

【0069】蛍光はレンズ55で集光され、蛍光フィルタ56を透過した後、カメラ57に入射し、冷却CCDで検出される(S6)。

【0070】このとき、エバネセント光は塩溶液にも照射され、塩溶液からも蛍光を発生するが、エバネセント光の到達距離は上述したように極めて短いので、塩溶液から発生する蛍光は極めて微弱である。

【0071】したがって、細胞中の蛍光色素を主に観測することができ、蛍光検出のS/N比が向上する。

【0072】次に試薬であるイオノマイシンを細胞に投与する。このとき、イオノマイシンは各ウェル21に対して異なる濃度のものを投与する(S7)。

【0073】その後、再度蛍光を検出する。このとき、任意の時間間隔で蛍光強度の経時変化を測定するようにしてもよい(S8)。

【0074】検出された蛍光は画像解析装置(図示せず)へ出力され、この画像解析装置で蛍光強度が解析される(S9)。

【0075】解析された試薬投与前後の蛍光強度の変化から細胞の応答(カルシウム濃度の変化)を検出し、細胞内のカルシウム濃度に対するイオノマイシンの効果を判定する(S10)。

【0076】なお、カルシウム濃度が上昇したときには蛍光強度が高くなる。

【0077】この蛍光検出装置50によれば、細胞中の蛍光色素から発生する蛍光を高S/N比で検出できるので、イオノマイシン投与前後の蛍光強度の変化を精度良く検出してイオノマイシンの濃度に対する影響をスクリーニングできる。

【0078】シート状の励起光を使用することによって

一度の励起光の照射でマイクロウェルプレート1全体にエバネセント波を発生させて、蛍光を検出することができる。

【0079】また、上記実施形態ではプリズム41、42と透明基板10とを別体としたが、プリズム41、42と透明基板10とを一体としてもよい。この構成によれば、プリズム41、42を透明基板10の上面10aにグリセロール等を介して密着する作業を省略することができる。

【0080】更に、上記実施形態ではプリズム41、42を透明基板10の上面10aに密着させたが、プリズム41、42を透明基板10の下面10bに密着させるようにしてもよい。

【0081】

【発明の効果】以上に説明したように請求項1記載の発明のマイクロウェルプレートによれば、境界面で全反射条件が維持され、ウェル形成部材から発生する蛍光及び塩溶液の蛍光が減少して蛍光検出のS/N比が向上する。

【0082】請求項2記載の発明のマイクロウェルプレートによれば、励起光を透明基板へ入射させるとき、励起光入射用光学部材を用いることによって透明基板の上方から励起光を所定の入射角度で透明基板内へ入射させることができるので、透明基板が薄い場合であっても容易に透明基板に励起光を入射させることができる。

【0083】請求項3記載の発明のマイクロウェルプレートによれば、透明基板の上面及び下面との間で全反射しながら伝搬した励起光を、透明基板内で散乱させることなく励起光出射用光学部材を介して外部へ出射させる

ことができるので、励起光が試料中に侵入して蛍光を発生させることがなく、S/N比をより向上させることができる。

【0084】請求項4記載の発明の蛍光検出装置によれば、試薬投与前後の蛍光強度の変化を精度良く検出して試薬の濃度に対する影響をスクリーニングできる。

【図面の簡単な説明】

【図1】図1はこの発明に係るマイクロウェルプレートの側面図である。

【図2】図2はマイクロウェルプレートの平面図である。

【図3】図3はマイクロウェルプレートを備える蛍光検出装置の概略構成図である。

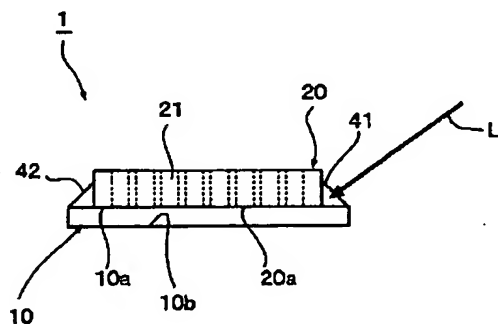
【図4】図4はスクリーニングを説明するフローチャートである。

【図5】図5は従来のマイクロウェルプレートを備える装置の概略構成図である。

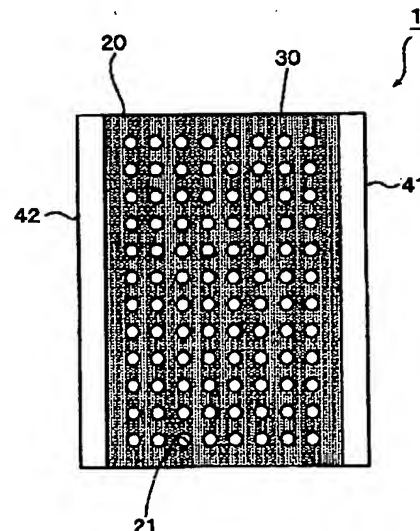
【符号の説明】

- 1 マイクロウェルプレート
- 10 透明基板
- 10a 上面
- 10b 下面
- 20 ウェル形成部材
- 21 ウェル
- 30 反射膜
- 41 プリズム（励起光入射用光学部材）
- 42 プリズム（励起光出射用光学部材）
- 50 蛍光検出装置

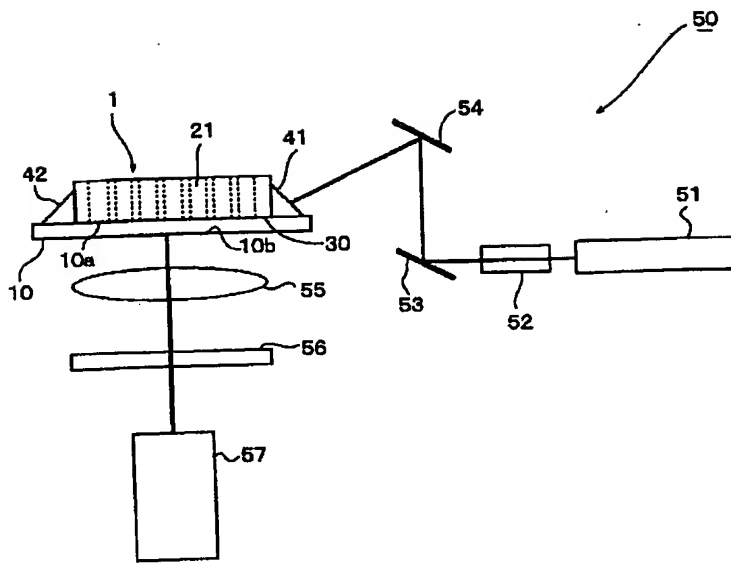
【図1】



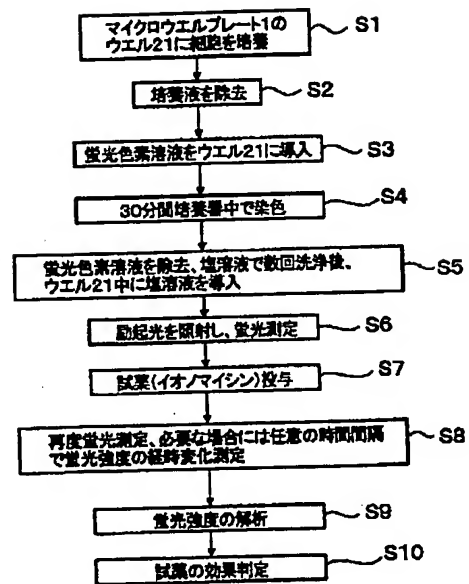
【図2】



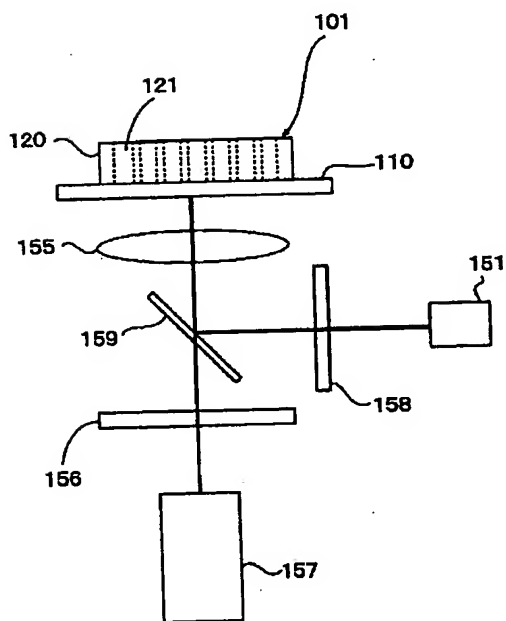
【図3】



【図4】



【図5】



BEST AVAILABLE COPY

フロントページの続き

F ターム(参考) 2G043 AA03 BA16 CA03 DA02 EA01
GA02 GA03 GA07 GB01 GB07
HA01 HA02 HA09 KA03 KA09
LA03 NA13
2G057 AA04 AB03 AB04 AB07 AB09
AC01 BA03 BD01 DA03 DB03
DC07
4B063 QA05 QQ05 QQ61 QQ89 QQ98
QR66 QR74 QS20 QS24 QS36
QS39 QX02

BEST AVAILABLE COPY

THIS PAGE BLANK (USPTO)